

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2002年7月4日 (04.07.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/051998 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, C07K 16/40, C12N 5/10, 9/50, G01N 33/15, 33/50, 33/573 // C12P 21/08, C12Q 1/37

薬株式会社内 Ibaraki (JP). 萩野 淳 (OGINO,Makoto) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県 つくば市 御幸が丘 21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/11251

(22) 国際出願日: 2001年12月21日 (21.12.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2000-393372

2000年12月25日 (25.12.2000) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都 中央区 日本橋本町二丁目 3番 1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 山地 昇 (YAMAJI,Noboru) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県 つくば市 御幸が丘 21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 西村 耕一 (NISHIMURA,Kouichi) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県 つくば市 御幸が丘 21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 阿部 邦威 (ABE,Kunitake) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県 つくば市 御幸が丘 21 山之内製

(74) 代理人: 森田 審一, 外 (MORITA,Kenichi et al.); 〒173-0004 東京都 板橋区 板橋二丁目 67番 8号 板橋中央ビル 5階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイド」を参照。

(54) Title: NOVEL PROTEASE

(54) 発明の名称: 新規プロテアーゼ

(57) Abstract: A novel polypeptide; a polynucleotide encoding this polypeptide; an expression vector containing this polynucleotide; cells transfected with this expression vector; an antibody binding to the above polypeptide or a fragment thereof; and a process for producing the above polypeptide. The above-described polypeptide is a novel protease.

(57) 要約:

WO 02/051998 A1

新規ポリペプチド、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、前記発現ベクターでトランスフェクションされた細胞、前記ポリペプチドに結合する抗体又はその断片、及び前記ポリペプチドの製造方法を開示する。

前記ポリペプチドは、新規プロテアーゼである。

## 明細書

## 新規プロテアーゼ

## 技術分野

本発明は、新規なプロテアーゼに関する。

## 背景技術

ADAMTS (A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin motif) は、ディスインテグリン様ドメイン、金属プロテアーゼ様ドメイン、及びトロンボスpondin I型繰り返し配列（以下、TSP-1繰り返し配列と称する）を含む分子群であり、現在までに9種のヒトADAMTS分子が報告されている。

前記ヒトADAMTS分子の中で、ADAMTS 4（アグリカナーゼ-1）及びADAMTS 11（アグリカナーゼ-2）では、細胞外基質アグリカンを第373番目のグルタミン酸残基と第374番目のアラニン残基との間（Glu<sup>373</sup>—Ala<sup>374</sup>の間）で選択的に切断する活性が示され、関節炎や変形性関節症における軟骨細胞外基質アグリカンの分解の本体の酵素である可能性が示唆されていた（Tortorella M. D. ら, Science, 284, 1664-1666, 1999；及びAbbaszade I. ら, J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999）。また、ADAMTS 2（プロコラーゲンI N-プロティナーゼ）は、I型コラーゲンプロ体のN末端の切断除去酵素として、I型コラーゲンのプロ体から成熟型への転換に関与し、コラーゲン線維の形成に重要な役割を果たしており、その遺伝子の異常とVIIC型エーラース・ダンロス（Ehlers-Danlos）症候群との関連性が示されている（Collige A. ら, Am. J. Hum. Genet., 65, 308-317, 1999）。

すなわち、ADAMTS分子は、アグリカンやコラーゲン等の細胞外マトリクスの分解及び成熟といった代謝に関与することが示されている。

一方、慢性腎不全は、糸球体硬化及び腎間質線維化を特徴とする疾患であり、細胞外マトリクス成分の質的変化及び／又は量的増加が主要な発病及び進行機序とされている。腎不全疾患モデルを用いた実験において、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ ) の特異的な作用抑制タンパク質であるデコリンの遺伝子導入 (Isaka Y. ら, *Nature Med.*, 2, 418-423, 1996) や抗TGF- $\beta$ 投与 (Ziyadeh F. N. ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 8015-8020, 2000; Sharma K. ら, *Diabetes*, 45, 522-530, 1996; 及びBorder W. A. ら, *Nature*, 346, 371-374, 1990) が有効性を示したことより、TGF- $\beta$ の生理機能を抑制又は阻害することが慢性腎不全の治療に繋がると考えられている。

しかし、満足のいく慢性腎不全治療薬がない現状のもと、期待されているにも係わらず、現在までにTGF- $\beta$ 阻害剤は上市されていない。

### 発明の開示

TGF- $\beta$ は、多種多様の生理機能を示す分化及び成長因子であるため、TGF- $\beta$ の生理機能全てを阻害することは、長期投与が想定される慢性腎不全の治療においては副作用の観点から危険である。TGF- $\beta$ の生理作用のうち、細胞外マトリクス成分の質的変化及び量的増加に係わる部分だけを抑制又は阻害することが望ましい。

本発明の課題は、TGF- $\beta$ により誘導され、細胞外マトリクスの代謝に関与する、慢性腎不全治療剤のスクリーニングツールとして有用な新規のプロテアーゼ、及びそれをコードする新規のポリヌクレオチドを提供することにある。

本発明者は、前記課題を解決するために鋭意研究を行なった結果、ヒト胎児腎臓cDNAより、配列番号2で表される配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列からなり、1224個のアミノ酸残基からなる新規プロテアーゼをコードするポリヌクレオチドを見出した。更に、本発明者は、この新規プロテアーゼの750アミノ酸残基からなるN末端側部分断片も、充分なプロテアーゼ活性を有することを見出した。また、前記プロテアーゼは、(1) ADAM

TSプロテアーゼに分類されることより、細胞外マトリックスの代謝に関与するプロテアーゼであると考えられること、(2)実際に、ヒトの腎臓での発現が認められること、(3)腎臓の初代培養細胞において、TGF- $\beta$ により発現誘導されること、及び(4)腎不全モデル動物において、その遺伝子発現量が増加していることを見出した。これらにより、本発明のプロテアーゼは、腎不全の原因となるポリペプチドであり、本発明のポリペプチドを用いて、そのプロテアーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングすることにより、TGF- $\beta$ の生理作用のうち、細胞外マトリックス成分の質的変化及び量的増加に係わる部分だけを抑制又は阻害する慢性腎不全治療剤として有用な物質をスクリーニングすることができることを明らかにし、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

- [1] (1)配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列、(2)配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列、あるいは、(3)配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド；
- [2]配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド；
- [3] (1)配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列、あるいは、(2)配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド；
- [4] (1)配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、(2)配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列との相同性が、

90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド；

[5] (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列との相同性が、90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド；

[6] (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる、あるいは、(3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなるポリペプチド；

[7] [1]～[6]記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[8] [7]記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター；

[9] [8]記載の発現ベクターでトランスフェクションされた細胞；

[10] [1]～[6]記載のポリペプチドに結合する抗体又はその断片；

[11] [9]記載の細胞を培養し、[1]～[6]記載のポリペプチドを回収することを含む、[1]～[6]記載のポリペプチドの製造方法；

[12] (1) [1]～[6]記載のポリペプチドと、(2)  $\alpha_2$ -マクログロブリンと、(3) 試験化合物とを接触させる工程、及び前記ポリペプチドと $\alpha_2$ -マクログロブリンとが、SDS及び／又は還元剤では解離しない複合体を形成するか否かを分析する工程を含む、試験化合物が前記ポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害するか否かを検出する方法；

[13] [12]記載の方法による検出工程、及びプロテアーゼ活性を阻害する物質を選択する工程を含む、[1]～[6]記載のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法；

[14] [13]記載の方法により、慢性腎不全治療用物質をスクリーニングする方法；並びに

[15] [12]記載の方法による検出工程、及び

## 製剤化工程

を含む、慢性腎不全治療用医薬組成物の製造方法  
に関する。

本明細書において「プロテアーゼ活性」とは、血清中に存在するプロテアーゼ阻害タンパク質である $\alpha_2$ -マクログロブリンと、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）及び／又は還元剤では解離しない複合体を形成することができる性質を意味する。

## 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

### 〔1〕本発明のポリペプチド

本発明のポリペプチドには、

- (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列を含むポリペプチド；
- (2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列の1又は複数箇所において、全体として1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド（以下、機能的等価改変体と称する）；並びに
- (3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド（以下、相同ポリペプチドと称する）

が含まれる。

本発明のポリペプチドである「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列を含むポリペプチド」は、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチドである限り、特に限定されるものではなく、例えば、

(1 a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチド；

(1 b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列のN末端及び／又はC末端に、適当なマーカー配列等が付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、プロテアーゼ活性を示す融合ポリペプチド；

(1 c) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列のC末端に、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第751番～第1224番のアミノ酸からなる配列又はそのC末端から1～473個のアミノ酸が欠失した配列が付加されたアミノ酸配列〔すなわち、C末端が第751番～第1224番のアミノ酸のいずれかである；以下、「配列番号2で表されるアミノ酸配列又はそのC末端欠失配列」と称する〕を有するポリペプチド；並びに

(1 d) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又はそのC末端欠失配列において、そのN末端及び／又はC末端に、適当なマーカー配列等が更に付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、プロテアーゼ活性を示す融合ポリペプチド  
などが含まれる。

本明細書において、或るポリペプチド（以下、試験ポリペプチドと称する）が「プロテアーゼ活性を示す」か否かを判定する方法（以下、「プロテアーゼ活性の判定方法」と称することがある）は、「血清中に存在するプロテアーゼ阻害タンパク質である $\alpha_2$ -マクログロブリンと、SDS及び／又は還元剤では解離しない複合体を形成することのできる性質」を示すか否かを判定することができる限り、特に限定されるものではないが、例えば、前記の試験ポリペプチドと、血清中に存在するプロテアーゼ阻害タンパク質である $\alpha_2$ -マクログロブリンとを接触させ、SDS及び／又は還元剤〔例えば、2-メルカプトエタノール（2-ME）〕では解離しない複合体を形成するか否かを分析することにより、確認することができ、具体的には、例えば、実施例4に記載の方法で確認することができる。

$\alpha_2$ -マクログロブリンは、血清中に存在するプロテアーゼ阻害タンパク質であり、多くのプロテアーゼと複合体を形成することが知られている。この複合体

の形成はプロテアーゼ活性に依存しており、また、形成された複合体は、プロテアーゼと $\alpha_2$ -マクログロブリンとがアミド結合したものであるため、SDS又は還元剤（例えば、2-ME）では解離しないことが知られている（Feinman R. D. ら, Ann. New York Acad. Sci., 737, 245-266, 1994；及びKuno K. ら, J. Biol. Chem., 274, 18821-18826, 1999）。

前記ポリペプチド（1a）、すなわち、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチド」は、プロテアーゼ活性を示す、750個のアミノ酸残基からなる新規プロテアーゼである。前記ポリペプチド（1a）は、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなるポリペプチド」の部分ポリペプチドに相当する。

本発明のポリペプチドにおける前記マーカー配列としては、例えば、ポリペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、あるいは、精製等を容易に行なうための配列を用いることができ、例えば、FLAGタグ、ヘキサヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げることができる。

本発明の機能的等価改変体は、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列の1又は複数箇所において、1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個（例えば、1～数個）のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチドである限り、特に限定されるものではなく、その起源もヒトに限定されない。

例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチドのヒトにおける変異体が含まれるだけでなく、ヒト以外の生物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）由来の機能的等価改変体が含まれる。更には、それらの天然ポリペプチド（すなわち、ヒト由来の変異体、あるいは、ヒト以外の生物由来の機能的等価改変体）をコードするポリヌクレオチドを元にして、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチドをコードするポリヌク

レオチドを元にして、遺伝子工学的に人為的に改変したポリヌクレオチドを用いて製造したポリペプチドなどが含まれる。なお、本明細書において「変異体」(variation)とは、同一種内の同一ポリペプチドにみられる個体差、あるいは、数種間の相同ポリペプチドにみられる差異を意味する。

配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチドのヒトにおける変異体、あるいは、ヒト以外の生物由来の機能的等価改変体は、当業者であれば、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列（例えば、配列番号1で表される塩基配列）の情報を基にして、取得することができる。なお、遺伝子組換え技術については、特に断りがない場合、公知の方法（例えば、Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning—A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989）に従って実施することができる。

例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列の情報を基にして適当なプライマー又はプローブを設計し、前記プライマー又はプローブと、目的とする生物〔例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）〕由来の試料（例えば、総RNA若しくはmRNA画分、cDNAライブラリー、又はファージライブラリー）とを用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法（Saiki, R. K. ら, Science, 239, 487-491, 1988）又はハイブリダイゼーション法を実施することにより、ポリペプチドコードするポリヌクレオチドを取得し、そのポリヌクレオチドを適当な発現系を用いて発現させ、発現したポリペプチドが、例えば、実施例4に記載の方法により、プロテアーゼ活性を示すことを確認することにより、所望のポリペプチドを取得することができる。

また、前記の遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドは、常法、例えば、部位特異的突然変異誘発法（site-specific mutagenesis; Mark, D. F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,

81, 5662-5666, 1984)により、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを取得し、そのポリヌクレオチドを適当な発現系を用いて発現させ、発現したポリペプチドが、例えば、実施例4に記載の方法により、プロテアーゼ活性を示すことを確認することにより、所望のポリペプチドを取得することができる。

本発明の機能的等価改変体には、例えば、

(2 a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列の1又は複数箇所において、全体として1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を有し、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド；

(2 b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列の1又は複数箇所において、全体として1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入され、更に、そのN末端及び／又はC末端に適当なマーカー配列等が付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、プロテアーゼ活性を示す融合ポリペプチド；

(2 c) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列の1又は複数箇所において、全体として1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入され、更に、そのC末端に、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第751番～第1224番のアミノ酸からなる配列又はそのC末端から1～473個のアミノ酸が欠失した配列が付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド；並びに

(2 d) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列の1又は複数箇所において、全体として1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入され、更に、そのC末端に、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第751番～第1224番のアミノ酸からなる配列又はそのC末端から1～473個のアミノ酸が欠失した配列が付加されたアミノ酸配列であって、そのN末端及び／又はC末端に、適当なマーカー配列等が更に付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、プロテアーゼ活性を示す融合ポリペプチド

などが含まれる。

本発明の相同ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチドである限り、特に限定されるものではないが、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列に関して、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列に関して、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含む。本発明の相同ポリペプチドとしては、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列との相同性が90%以上（より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上）であるアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチドがより好ましい。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLAST (Basic local alignment search tool; Altschul, S. F. ら, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) により得られた値を意味し、アミノ酸配列の相同性は、BLAST検索アルゴリズムを用いて決定することができる。具体的には、BLASTパッケージ (sgi 32 bit版, バージョン2.0.12; NCBIより入手) のblastpプログラム (Tatiana A. Tatusova及びThomas L. Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250, 1999) を用い、デフォルトパラメーターに従って算出することができる。ペアワイズ・アラインメント・パラメーターとして、プログラム名「blastp」を使用し、Gap挿入Cost値を「0」で、Gap伸長Cost値を「0」で、Query配列のフィルターとして「SEG」を、Matrixとして「BLOSUM62」をそれぞれ使用する。

以上、本発明のポリペプチドについて説明したが、本発明のポリペプチドとしては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチド」、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなるポリペプチド」、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列の1又は複数の箇所において、全体として1～10個（好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド」、あるいは、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列の1又は複数の箇所において、全体として1～10個（好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド」が好ましく、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなるポリペプチド」、あるいは、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなるポリペプチド」がより好ましい。

## 〔2〕本発明のポリヌクレオチド

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである限り、特に限定されるものではなく、例えば、配列番号1で表される塩基配列における第1番～第2250番の塩基からなる配列を含むポリヌクレオチドを挙げることができ、配列番号1で表される塩基配列における第1番～第2250番の塩基からなるポリヌクレオチドが特に好ましい。なお、本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNA及びRNAの両方が含まれる。

本発明のポリヌクレオチドの製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、（1）PCRを用いた方法、（2）常法の遺伝子工学的手法（すなわち、cDNAライブラリーで形質転換した形質転換株から、所望のcDNAを含む形質転換株を選択する方法）を用いる方法、又は（3）化学合成法などを挙げることができる。以下、各製造方法について、順次、説明する。

前記（1）のPCRを用いた方法では、例えば、以下の手順により、本発明の

ポリヌクレオチドを製造することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドを產生する能力を有するヒト細胞又は組織からmRNAを抽出する。次いで、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に基づいて、本発明のポリペプチドに相当するmRNAの全長を挟むことのできる2個1組のプライマーセット、あるいは、その一部のmRNA領域を挟むことのできる2個1組のプライマーセットを作成する。抽出した前記mRNAを鑄型とする逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を行なうことにより、本発明のポリペプチドの全長cDNA又はその一部を得ることができる。

より詳細には、まず、本発明のポリペプチドの產生能力を有する細胞又は組織から、本発明のポリペプチドをコードするmRNAを含む総RNAを既知の方法により抽出する。抽出法としては、例えば、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法、又はグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法等を挙げることができるが、グアニジン・チオシアネート塩化セシウム法を用いることが好ましい。本発明のポリペプチドの產生能力を有する細胞又は組織は、例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその一部を用いたノーザンプロッティング法、あるいは、本発明のポリペプチドに特異的な抗体を用いたウエスタンプロッティング法などにより特定することができる。

続いて、抽出したmRNAを精製する。mRNAの精製は常法に従えばよく、例えば、mRNAをオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着後、溶出させることにより精製することができる。所望により、ショ糖密度勾配遠心法等によりmRNAを更に分画することもできる。また、mRNAを抽出しなくても、市販されている抽出精製済みのmRNAを用いることもできる。

次に、精製されたmRNAを、例えば、ランダムプライマー、オリゴdTプライマー、及び/又はカスタム合成したプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行ない、第1鎖cDNAを合成する。この合成は、常法によって行なうことができる。得られた第1鎖cDNAを用い、目的ポリヌクレオチドの全長又は一部の領域を挟んだ2種類のプライマーを用いてPCRを実施し、目的とするcDNA

を増幅することができる。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、前記DNAを制限酵素等で切断し、接続することによって目的とするDNA断片を得ることもできる。

前記(2)の常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、以下の手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

まず、前記のPCRを用いた方法で調製したmRNAを鑄型として、逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成した後、この1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成する。その方法としては、例えば、S1ヌクレアーゼ法(Efstratiadis, A. ら, Cell, 7, 279-288, 1976)、Land法(Land, H. ら, Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266, 1981)、O. Joon Yoo法(Yoo, O. J. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053, 1983)、又はOkayama-Berg法(Okayama, H. 及びBerg, P., Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, 1982)などを挙げることができる。

次に、前記2本鎖cDNAを含む組換えプラスミドを作製した後、大腸菌(例えば、DH5 $\alpha$ 株、HB101株、又はJM109株)に導入して形質転換させ、例えば、テトラサイクリン、アンピシリン、又はカナマイシン等に対する薬剤耐性を指標として、組換体を選択する。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合には、Hanahanの方法(Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166, 557-580, 1983)、すなわち、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、又はRbClを共存させて調製したコンピテント細胞に、前記組換えDNA体を加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしては、プラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターを用いることもできる。

このようにして得られる形質転換株から、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する方法としては、例えば、以下に示す(i)合成オリゴヌクレオチドプローブを用いる形質転換株スクリーニング法、(ii)PCRにより作製したプローブを用いる形質転換株スクリーニング法、(iii)本発明のポリペプチドに対する抗体を用いる形質転換株スクリーニング法、又は(iv)セレクティブ・ハイ

ブリダイゼーション・トランスレーション系を用いる形質転換株スクリーニング法を採用することができる。

前記 (i) の合成オリゴヌクレオチドプローブを用いる形質転換株スクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的の cDNA を有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドの全部又は一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブ ( $^{32}\text{P}$  又は  $^{33}\text{P}$  で標識する) として、形質転換株のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルター又はポリアミドフィルターとハイブリダイズさせ、得られた陽性株を検索して、これを選択する。なお、プローブ用のオリゴヌクレオチドを合成する場合には、コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列とすることもできるし、あるいは、考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列とすることもできる。後者の場合には、イノシンを含ませてその種類を減らすことができる。

前記 (ii) のPCRにより作製したプローブを用いる形質転換株スクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的の cDNA を有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドの一部に対応するセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの各オリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてPCRを行ない、目的ポリペプチドの全部又は一部をコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる鑄型DNAとしては、本発明のポリペプチドを產生する細胞のmRNAより逆転写反応にて合成したcDNA、又はゲノムDNAを用いることができる。このようにして調製したDNA断片を、例えば、 $^{32}\text{P}$  又は  $^{33}\text{P}$  で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーション又はブラークハイブリダイゼーションを行なうことにより、目的の cDNA を有する形質転換株を選択する。

前記 (iii) の本発明のポリペプチドに対する抗体を用いる形質転換株スクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的の cDNA を有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、予め、cDNAを発現ベクターに組込み、形質転換株の培養上清、

細胞内、又は細胞表面にポリペプチドを産生させ、本発明のポリペプチドに対する抗体及び前記抗体に対する2次抗体を用いて、所望のポリペプチド産生株を検出し、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する。

前記(iv)のセレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーション系を用いる形質転換株スクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、形質転換株から得られるcDNAを、ニトロセルロースフィルター等にプロットし、本発明のポリペプチドの産生能力を有する細胞から別途調製したmRNAをハイブリダイズさせた後、cDNAに結合したmRNAを解離させ、回収する。回収されたmRNAを適当なポリペプチド翻訳系、例えば、アフリカツメガエルの卵母細胞へ注入したり、あるいは、ウサギ網状赤血球ライゼート又は小麦胚芽等の無細胞系を用いて、ポリペプチドに翻訳させる。本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて検出して、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明のポリヌクレオチドを採取する方法は、公知の方法（例えば、Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning—A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989）に従って実施することができる。例えば、細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、得られたプラスミドDNAからcDNA領域を切り出すことにより行なうことができる。

前記(3)の化学合成法を用いた方法では、例えば、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することによって、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。各DNAは、DNA合成機【例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman社製)、又は394 DNA / RNA Synthesizer (Applied Biosystems社製)など】を用いて合成することができる。

また、本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの情報に基づいて、例えば、ホスファイト・トリエステル法 (Hunkapiller, M. ら, N

ature, 10, 105-111, 1984) 等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンは、それ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば、利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、常法に従って決定することができる (Crant ham, R. ら, Nucleic Acids Res., 9, r43-r74, 1981)。更に、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的突然変異誘発法 (site specific mutagenesis) (Mark, D. F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984) 等により実施することができる。

これまで述べた種々の方法により得られるDNAの配列決定は、例えば、マキサムーギルバートの化学修飾法 (Maxam, A. M. 及び Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980) やジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. 及び Vieira, J., Gene, 19, 269-276, 1982) 等により行なうことができる。

### [3] 本発明の発現ベクター及び細胞

単離された本発明のポリヌクレオチドを、適当なベクターDNAに再び組込むことにより、真核生物又は原核生物の宿主細胞をトランスフェクションすることができる。また、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現させることができる。

本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、本発明のポリヌクレオチドを挿入することにより得られる発現ベクターを挙げることができる。

また、本発明の細胞も、本発明の前記発現ベクターでトランスフェクションされ、本発明のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、本発明のポリヌクレオチドが、宿主細胞の染色体に組み込まれた細胞である

こともできるし、あるいは、本発明によるポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形で含有する細胞であることもできる。また、本発明のポリペプチドを発現している細胞であることもできるし、あるいは、本発明のポリペプチドを発現していない細胞であることもできる。本発明の細胞は、例えば、本発明の発現ベクターにより、所望の宿主細胞をトランスフェクションすることにより得ることができる。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、及び酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるCOS細胞 (Gluzman, Y., Cell, 23, 175-182, 1981)、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Uribalb, G. 及び Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞、及び前記HEK293細胞にエプスタイン・バーウイルスのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞 (Invitrogen社) 等を挙げることができる。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用することができ、更に必要により、複製起点を有していることができる。前記発現ベクターの例としては、例えば、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Subramani, S. ら, M. I. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトの延長因子プロモーターを有するpEF-BOS (Mizushima, S. 及び Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、又はサイトメガロウイルスプロモーターを有するpCEP4 (Invitrogen社) 等を挙げることができる。

宿主細胞として293-EBNA細胞を用いる場合には、発現ベクターとして、エプスタイン・バーウイルスの複製起点を有し、293-EBNA細胞で自己増殖が可能なpCEP4 (Invitrogen社) などを用いることができる。

また、宿主細胞としてCOS細胞を用いる場合には、発現ベクターとして、S

V40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、更に、転写プロモーター、転写終結シグナル、及びRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. 及びTakebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS (Mizushima, S. 及びNagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、又はpCDM8 (Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987) 等を挙げることができる。

前記発現ベクターは、例えば、DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. 及びMagnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法 (Graham, F. L. 及びvan der Ed, A. J., Virology, 52, 456-457, 1973)、市販のトランスフェクション試薬 (例えば、FuGENE<sup>TM</sup> 6 Transfection Reagent; Boehringer Mannheim社製) を用いた方法、あるいは、電気パルス穿孔法 (Neumann, E. ら, EMBO J., 1, 841-845, 1982) 等により、COS細胞に取り込ませることができる。

更に、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現することのできるベクター、例えば、pRSVneo (Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 又はpSV2-neo (Southern, P. J. 及びBerg, P., J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982) 等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより、本発明のポリペプチドを安定に产生するトランスフェクションされた細胞を得ることができる。

本発明の細胞は、常法 (例えば、日本生化学会編, 「新生化学実験講座18 細胞培養技術」, 東京化学同人, 1990) に従って培養することができ、前記

培養により細胞外に本発明のポリペプチドが生産される。前記培養に用いることのできる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種の培地を適宜選択することができる。例えば、COS細胞の場合には、例えば、RPMI-1640培地又はダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に、必要に応じて牛胎仔血清(FBS)等の血清成分を添加した培地を使用することができる。また、293-EBNA細胞の場合には、牛胎仔血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地にG418を加えた培地を使用することができる。

本発明の細胞を培養することにより、前記細胞の細胞外に生産される本発明のポリペプチドは、前記ポリペプチドの物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法(例えば、岡田雅人及び宮崎香編、「改訂タンパク質実験ノート上・下」、羊土社、1999)により、分離精製することができる。具体的には、本発明のポリペプチドを含む培養液を、例えば、通常のタンパク質沈殿剤による処理、限外濾過、各種液体クロマトグラフィー[例えば、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、又は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等]、若しくは透析法、又はこれらの組合せ等により、本発明のポリペプチドを精製することができる。

本発明のポリペプチドは、マーカー配列とインフレームで融合して発現させることにより、本発明のポリペプチドの発現の確認、又は精製等が容易になる。前記マーカー配列としては、例えば、FLAGタグ、ヘキサヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げることができる。また、マーカー配列と本発明のポリペプチドとの間に、プロテアーゼ(例えば、エンテロキナーゼ、ファクターXa、又はトロンビンなど)が認識する特異的なアミノ酸配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去することが可能である。

#### 〔4〕本発明の検出方法及びスクリーニング方法

本発明のポリペプチドを用いると、試験化合物が、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害するか否かを検出することができる。また、この本発明の

検出方法を用いると、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングすることができる。本発明のポリペプチドであるMDTS9 (Metalloprotease and Disintegrin with Thrombospondin type-1 repeats 9) は、その配列よりADAMTSプロテアーゼであると考えられることから、細胞外マトリクスの代謝に関与するプロテアーゼであると考えられ、後述の実施例5及び実施例8に示すように、腎臓で発現しているタンパク質であり、しかも、後述の実施例6に示すように、TGF- $\beta$ により誘導されるADAMTSプロテアーゼである。従って、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質は、TGF- $\beta$ の生理作用のうち、細胞外マトリクス成分の質的変化及び量的増加に係わる部分だけを抑制又は阻害する可能性が高く、長期投与が想定される慢性腎不全治療剤の有効成分として有用であり、本発明のポリペプチドそれ自体を、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質、あるいは、慢性腎不全治療用物質のスクリーニングツールとして使用することができる。

本発明の検出方法又はスクリーニング方法にかけることのできる試験化合物としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアル・ケミストリー技術（Terrett, N. K. ら, *Tetrahedron*, 51, 8135-8137, 1995）又は通常の合成技術によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法（Felici, F. ら, *J. Mol. Biol.*, 222, 301-310, 1991）などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。前記公知化合物には、例えば、プロテアーゼ阻害活性を有することが知られているが、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性に対して阻害するか否かが不明な化合物（ペプチドを含む）が含まれる。また、微生物の培養上清、植物若しくは海洋生物由来の天然成分、又は動物組織抽出物などもスクリーニングの試験化合物として用いることができる。更には、本発明のスクリーニング方法により選択された化合物（ペプチドを含む）を、化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を用いることができる。

本発明の検出方法は、

(1) 本発明のポリペプチドと、(2)  $\alpha_2$ -マクログロブリンと、(3) 試験化合物とを接触させる工程、及び

本発明のポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンとが、SDS 及び／又は還元剤（例えば、2-ME）では解離しない複合体を形成するか否かを分析する工程を含む。

本発明の検出方法においては、試験ポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンとを接触させる代わりに、本発明のポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンと試験化合物とを接触させること以外は、先述のプロテアーゼ活性の判定方法と同様にして実施することができる。すなわち、本発明の検出方法では、本発明のポリペプチドと基質用ポリペプチドと試験化合物とを接触させ、前記試験化合物の存在下において、本発明のポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンとが SDS 及び／又は還元剤（例えば、2-ME）では解離しない複合体を形成するか否かを分析することにより、前記試験化合物が、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害するか否かを検出する。試験化合物の存在下において、本発明のポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンとが SDS 及び／又は還元剤（例えば、2-ME）では解離しない複合体を形成しないか、あるいは、前記形成の程度が減少する場合には、前記試験化合物が、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害すると判断することができる。

本発明のスクリーニング方法では、本発明の検出方法により、試験化合物が、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害するか否かを検出し、その結果に基づいて、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質、あるいは、慢性腎不全治療用物質を選択する。より具体的には、例えば、本発明のポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンと試験化合物とを接触させ、前記試験化合物の存在下における本発明のポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンとの複合体の形成の有無又は程度を指標として、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質、あるいは、慢性腎不全治療用物質を選択することができる。試験化合物の存在下において、本発明のポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンとが SDS 及び／又は還元剤（例えば、2-ME）では解離しない複合体を形成しないか、あるいは、前記形成の程度が減少する場合には、前記試験化合物が、本発

明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質、あるいは、慢性腎不全治療用物質であると判定することができる。

#### 〔5〕本発明の慢性腎不全治療用医薬組成物の製造方法

本発明には、本発明のスクリーニング方法により選択される、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質を有効成分とする慢性腎不全治療用医薬組成物が含まれる。

慢性腎不全治療用医薬組成物の品質規格の確認試験において、本発明の検出方法により、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害するか否かを検出する工程、及び製剤化工程を含む、慢性腎不全治療用医薬組成物の製造方法も本発明に含まれる。

また、前記検出工程を含む本発明のスクリーニング方法で得られた物質を製剤化することからなる、慢性腎不全治療用医薬組成物の製造方法も本発明に含まれる。

本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて調製することができる。

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注若しくは筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあっては、静注等の非経口投与又は消化を受けない製剤化手段、例えば、WO 95/28963号パンフレットに記載の製剤化手段が好ましい。

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、又はメタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆す

ることができる。

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性若しくは非水性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレン glycole、ポリエチレン glycole、植物油（例えば、オリーブ油）、アルコール類（例えば、エタノール）、又はポリソルベート 80 等を含むことができる。前記組成物は、更に湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。

投与量は、前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して適宜決定することができる。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重 60 kg として）において、1 日につき約 0.01 ~ 1000 mg、好ましくは 0.01 ~ 100 mg である。また、非経口投与の場合、注射剤の形では、1 日につき 0.01 ~ 1000 mg、好ましくは 0.01 ~ 100 mg である。

#### 〔6〕本発明の抗体又はその断片

本発明のポリペプチドに反応する抗体（例えば、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体）は、各種動物に、本発明のポリペプチド、又はその断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入したプラスミドを用いて、DNAワクチン法 (Raz, E. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-952

3, 1994; 又はDonnelly, J. J. ら, J. Infect. Dis., 173, 314-320, 1996) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は、例えば、本発明のポリペプチド又はその断片を適當なアジュバント（例えば、フロイント完全アジュバントなど）に乳濁した乳濁液を、腹腔、皮下、又は静脈等に免疫して感作した動物（例えば、ウサギ、ラット、ヤギ、又はニワトリ等）の血清又は卵から製造することができる。このように製造された血清又は卵から、常法のポリペプチド単離精製法によりポリクローナル抗体を分離精製することができる。そのような分離精製方法としては、例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、又はDEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、若しくはプロテインAアガロース等によるクロマトグラフィー法を挙げることができる。

モノクローナル抗体は、例えば、ケーラーとミル斯坦の細胞融合法（K. H. L. er, G. 及びM. ilstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975）により、当業者が容易に製造することができる。

すなわち、本発明のポリペプチド又はその断片を適當なアジュバント（例えば、フロイント完全アジュバントなど）に乳濁した乳濁液を、数週間おきにマウスの腹腔、皮下、又は静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、例えば、ヒポキサンチシングアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損又はチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを有するミエローマ細胞（例えば、マウスミエローマ細胞株P3X63Ag8. U1）を利用することができる。また、融合剤としては、例えば、ポリエチレングリーコールを利用することができる。更には、ハイブリドーマ作製における培地として、例えば、イーグル氏最小必須培地、ダルベッコ氏変法最小必須培地、又はRPMI-1640などの通常よく用いられている培地に、10~30%のウシ胎仔血清を適宜加えて用いることができる。融合株は、HAT選択法により選択することができる。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA法又は免疫組織染色法などの周知の方法により行ない、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択することができ

る。また、限界希釈法によってサブクローニングを繰り返すことにより、ハイブリドーマの単クローニング性を保証することができる。このようにして得られるハイブリドーマは、培地中で2～4日間、あるいは、プリスタンで前処理したBALB/c系マウスの腹腔内で10～20日間培養することで、精製可能な量の抗体を産生することができる。

このように製造されたモノクローナル抗体は、培養上清又は腹水から常法のポリペプチド単離精製法により分離精製することができる。そのような分離精製方法としては、例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、又はDEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、若しくはプロテインAアガロース等によるクロマトグラフィー法を挙げることができる。

また、モノクローナル抗体又はその一部分を含む抗体断片は、前記モノクローナル抗体をコードする遺伝子の全部又は一部を発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞（例えば、大腸菌、酵母、又は動物細胞）に導入して生産させることもできる。

以上のように分離精製された抗体（ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を含む）について、常法により、ポリペプチド分解酵素（例えば、ペプシン又はパパイン等）によって消化を行ない、引き続き、常法のポリペプチド単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、 $F(ab')_2$ 、Fab、Fab'、又はFvを得ることができる。

更には、本発明のポリペプチドに反応する抗体を、クラクソンらの方法又はゼベデーラの方法（Clackson, T. ら, Nature, 352, 624-628, 1991; 又はZebdedee, S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179, 1992）により、一本鎖（single chain）Fv又はFabとして得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス（Lönborg, N. ら, Nature, 368, 856-859, 1994）に免疫することで、ヒト抗体を得ることも可能である。

## 実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、特に断らない限り、公知の方法（例えば、Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning—A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989）に従って実施した。

実施例1：C末FLAG付加型発現ベクターの作製

プラスミドpCEP4（インビトロジェン社製）を、制限酵素Cla I及びNsi Iで切断し、平滑末端化した後、自己連結反応を行なうことにより、エプスタイン・バーウイルス由来のEBNA1発現ユニットを除去した発現ベクターpCEP4dを作製した。得られた発現ベクターpCEP4dを、制限酵素Nhe I及びBamH Iで切断した後、アガロースゲル抽出することにより得られた約7.7 kbpのDNA断片に、配列番号3で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号4で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをアニールさせて得られた二重鎖オリゴヌクレオチドを挿入することにより、発現ベクターpCEP4d-FLAGを作成した。なお、得られた発現ベクターが目的の配列を有することは、塩基配列により確認した。

得られた発現ベクターpCEP4d-FLAGを鑄型とし、配列番号5で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号6で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーとして、パイロベスト（PyroBest<sup>TM</sup>）DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）を用いてPCRを行なった。前記PCRでは、最初に94°C（2分間）で熱変性を行なった後、94°C（30秒間）と55°C（30秒間）と72°C（30秒間）とからなるサイクルを15回繰り返し、最後に72°C（7分間）の伸長反応を行なった。前記PCRにより生じた約0.4 kbpのDNA断片を制限酵素Spe Iで切断した後、このDNA断片を、制限酵素Xba Iで切断したpCEP4d-FLAG（約7.7 Kbp）に挿入することにより、発現ベクターpCEPdE2-FLAGを作成した。得られた発現ベクターpCEPdE2-FLAGにおいては、プロモーターから下流に向かって、クローニングサイトであるXba I認識配列、Nhe I認識配列、Not I認識配列、及びBamH I認識配列、並びにFLAGタグが

この順に配列されている。

実施例2：新規プロテアーゼ遺伝子MDTS9の全長ORF遺伝子のクローニング

配列番号7で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（5'側にS p e I認識配列及びK o z a k配列が付加してある）と配列番号8で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（5'側にN o t I認識配列が付加してある）との組み合わせをプライマーとし、ヒト胎児腎臓cDNA（Marathon-Ready™ cDNA；クロンテック社製）を鋳型として、DNAポリメラーゼ（TaKaRa LA Taq™；宝酒造社製）を用いてPCRを行なった。前記PCRでは、最初に94°C（2分間）で熱変性を行なった後、98°C（10秒間）と68°C（2分30秒間）とからなるサイクルを40回繰り返し、最後に68°C（7分間）の伸長反応を行なった。前記PCRにより生成した約2.2kbのDNA断片（5'側にS p e I認識配列及びK o z a k配列が付加され、3'側にN o t I認識配列が付加されている）を、プラスミドPCR2.1（インビトロジェン社製）にサブクローンすることにより、クローンpMDTS9Cys1を得た。

得られたプラスミドpMDTS9Cys1を制限酵素S p e I及びN o t Iで切断して生成した約2.2kbのDNA断片を、前記実施例1で構築したpCEPdE2-FLAGのXba I部位及びN o t I部位に挿入することにより、プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys1-FLAGを構築した。

配列番号9で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（5'側にS p e I認識配列及びK o z a k配列が付加してある）と配列番号10で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーとし、ヒト胎児腎臓cDNA（Marathon-Ready™ cDNA；クロンテック社製）を鋳型として、DNAポリメラーゼ（TaKaRa LA Taq™；宝酒造社製）を用いてPCRを行なった。前記PCRでは、最初に94°C（2分間）で熱変性を行なった後、98°C（10秒間）と68°C（30秒間）とからなるサイクルを45回繰り返し、最後に68°C（7分間）の伸長反応を行なった。前記PCRにより生成した約0.2kbのDNA断片（5'側にS p e I認識配列及び

Kozak配列が付加されている)を、プラスミドPCR2.1(インビトロジエン社製)にサブクローンすることにより、クローンpMDTS9(5S2-12)を得た。

得られたプラスミドpMDTS9(5S2-12)を制限酵素SpeI及びNcoIで切斷して生成した約0.2kbのSpeI-NcoI DNA断片Aと、先に得られたプラスミドpMDTS9Cys1を制限酵素NcoI及びNotIで切斷して生成した約2.0kbのNcoI-NotI DNA断片Bとを、前記実施例1で構築したpCEPdE2-FLAGのXbaI部位及びNotI部位に挿入することにより、プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAGを構築した。同様に、前記DNA断片Aと前記DNA断片Bとを、プラスミドpZER0-2(インビトロジエン社製)のSpeI及びNotI部位に挿入することにより、プラスミドpZER0-MDTS9Cys2を構築した。

配列番号11で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号12で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーとし、ヒト胎児腎臓cDNA(Marathon-Ready™ cDNA; クロンテック社製)を鑄型として、DNAポリメラーゼ(Takara LA Taq™; 宝酒造社製)を用いてPCRを行なった。前記PCRでは、最初に94°C(2分間)で熱変性を行なった後、98°C(10秒間)と68°C(2分30秒間)とからなるサイクルを40回繰り返し、最後に68°C(7分間)の伸長反応を行なった。前記PCRにより生成した約2.1kbのDNA断片を、プラスミドPCR2.1(インビトロジエン社製)にサブクローンすることにより、クローンpMDTS9-3Hを得た。

得られたプラスミドpMDTS9-3Hを制限酵素SphI及びNotIで切斷して生成した約2.1kbのDNA断片と、先に得られたプラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAGを制限酵素SphI及びNotIで切斷して生成した約9.3kbのDNA断片とを連結することにより、プラスミドpCEPdE2-MDTS9Full-FLAGを構築した。

このプラスミドpCEPdE2-MDTS9Full-FLAGは、新規プロ

テアーゼ遺伝子MDTS9の配列番号1で表される塩基配列における第1番～第3672番の塩基からなる遺伝子を含有し、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列のC末端に、配列番号21で表されるアミノ酸配列が付加したポリペプチドを、動物細胞を宿主として、発現することができる。

また、先に得られたプラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAGは、新規プロテアーゼ遺伝子MDTS9の配列番号1で表される塩基配列における第1番～第2250番の塩基からなる遺伝子を含有し、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列のC末端に、配列番号21で表されるアミノ酸配列が付加したポリペプチドを、動物細胞を宿主として、発現することができる。なお、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、ADAMTSプロテアーゼであると考えられる。

実施例3：MDTS9短長タンパク質(MDTS9Cys2)及びMDTS9全長タンパク質(MDTS9Full)の発現

前記実施例2で作製したプラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG又はプラスミドpCEPdE2-MDTS9Full-FLAG（あるいは、対照として、前記実施例1で作製したプラスミドpCEPdE2-FLAG）を、市販のトランスフェクション試薬（FuGENE<sup>TM</sup> 6 Transfection Reagent；ベーリンガー・マンハイム社製）を用いて、添付指示書に従い、血清培地[DMEM (GIBCO-BRL社)、10%牛胎児血清、100μg/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシン、及び250μg/mL-G418（ナカライトスク社製）]で培養していたHEK293-EBNA細胞（インビトロジェン社製）に導入した。

プラスミド導入後、そのまま48時間培養する（以下、血清培養と称する）か、あるいは、前記プラスミド導入後、そのまま16時間培養し、PBSで2回洗浄した後に、無血清培地[DMEM (GIBCO-BRL社)、100μg/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシン、250μg/mL-G418（ナカライトスク社製）]にて32時間培養した（以下、無血清培養と称する）。

前記血清培養又は無血清培養で得られた各培養液を、遠心分離器（8800型；久保田製作所社製）により遠心分離（3000 rpm, 10分間）することにより、培養上清を得た。また、前記培養液を除去した後に残った各細胞を、抽出液 [20 mmol/L-L-HEPES (pH 7.4)、1%トリトンX-100、1%グリセロール、0.1%ウシ血清アルブミン (BSA)] にて15分間処理した後、ピペッティングにより細胞を培養プレートより剥離し、得られた細胞懸濁液を遠心分離器（8800型；久保田製作所社製）により遠心分離（3000 rpm, 10分間）することにより、細胞膜結合画分（上清）と細胞画分（沈澱）とに分画した。

得られた各画分（すなわち、培養上清、細胞膜結合画分、及び細胞画分）における目的タンパク質の発現は、C末端に付加したFLAGタグに対する抗体（マウス抗FLAGモノクローナル抗体M2；シグマ社製）を用いたウエスタンプロットティングで確認した。すなわち、前記の各画分を、2-MEを用いた還元条件下、SDS/10%～20%アクリルアミドゲル（第一化学薬品社製）を用いて電気泳動した後、プロットティング装置を用いてポリビニリデンジフルオリド（PVDF）膜に転写した。転写後のPVDF膜に、ブロッキング剤（ブロックエース；大日本製薬社製）を添加してブロッキングした後、前記マウス抗FLAGモノクローナル抗体M2と、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgGポリクローナル抗体（ザイメッド社製又はタゴ社製）とを、順次反応させた。あるいは、前記ブロッキングに続いて、ビオチン化M2抗体（シグマ社製）と、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビシン（アマシャムファルマシアバイオテク社製）とを、順次反応させた。反応後、市販のウエスタンプロットティング検出システム（ECLウエスタンプロットティング検出システム；アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて、目的タンパク質の発現を確認した。

プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAGを導入した細胞を無血清培養することにより得られた各画分において検出されたタンパク質（すなわち、MDTS9短長タンパク質）のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）における見かけ上の分子質量は、培養上清において約55～65 KDa であり、細胞膜結合画分において約55～65 KDa であり、細胞

画分において 80~95 kDa であった。一方、プラスミド pCEPdE2-MDTs9Fu11-FLAG を導入した細胞を無血清培養することにより得られた各画分において検出されたタンパク質（すなわち、MDTs9全長タンパク質）は、主として細胞膜結合画分及び細胞画分に検出され、その SDS-PAGE における見かけ上の分子質量は、いずれも約 130~140 kDa であった。

実施例4：MDTs9短長タンパク質のプロテアーゼ活性の確認

(1) プラスミド pCEPdE2-MDTs9Cys2E/Q-FLAG の構築  
 クイックチェンジ・サイトダイレクテド・ミュータジェネシス・キット (QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit; ストラタジーン社製) を用い、添付の指示書に従って、活性中心と考えられる His-Glu-Ser-Gly-His (配列番号 22) の Glu (グルタミン酸) を Gln (グルタミン) に置換した遺伝子 MDTs9Cys2E/Q を含有するプラスミド pZErO-MDTs9Cys2E/Q を作製した。なお、鋳型としては、前記実施例 2 で作製したプラスミド pZErO-MDTs9Cys2 を用い、プライマーセットとしては、配列番号 13 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号 14 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いた。

得られたプラスミド pZErO-MDTs9Cys2E/Q を制限酵素 Sph I 及び Not I で切断して生成した約 2.3 kbp の DNA 断片を、前記実施例 1 で構築したプラスミド pCEPdE2-FLAG の Xba I 及び Not I 部位に挿入することにより、プラスミド pCEPdE2-MDTs9Cys2E/Q-FLAG を得た。

(2)  $\alpha_2$ -マクログロブリンとの複合体形成を指標としたプロテアーゼ活性の確認

前記実施例 2 で作製したプラスミド pCEPdE2-MDTs9Cys2-FLAG、又は前記実施例 4 (1) で作製したプラスミド pCEPdE2-MDTs9Cys2E/Q-FLAG (あるいは、対照として、前記実施例 1 で作製したプラスミド pCEPdE2-FLAG) でトランスフェクションした各細胞の血清培養の培養上清を、前記実施例 3 で示した手順と同様にして、2-ME を用

いた還元条件下、SDS-PAGEし、PVDF膜に転写した。転写後のPVDF膜に、ブロッキング剤（ブロックエース；大日本製薬社製）を添加してブロッキングした後、ヤギ抗 $\alpha_2$ -マクログロブリン抗体 [セダーレーン（CEDAR LANE）社製] と、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギ IgGポリクローナル抗体 [ザイメッド（Zymed Laboratories）社製] とを、順次反応させた。反応後、市販のウエスタンブロッティング検出システム（ECLウエスタンブロッティング検出システム；アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて、目的タンパク質の発現を確認した。

プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAGでトランスフェクションした細胞由来の血清培養の培養上清では、プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2E/Q-FLAG又はプラスミドpCEPdE2-FLAGでトランスフェクションした細胞由来の各血清培養の培養上清で検出されない約250kDaのバンドが検出された。この結果は、MDTS9短長タンパク質（MDTS9Cys2）が $\alpha_2$ -マクログロブリンと複合体を形成したことを示しており、従って、MDTS9短長タンパク質（MDTS9Cys2）にプロテアーゼ活性があることが確認された。

#### 実施例5：MDTS9遺伝子の組織発現分布の確認

市販のcDNAパネル [Clontech社製のMultiple Tissue cDNA (MTC<sup>TM</sup>) Panel] の内、Human MTC Panel I (カタログ番号：K1420-1)、Human MTC Panel II (カタログ番号：K1421-1)、Human Fetal MTC Panel (カタログ番号：K1425-1)、及びHuman Tumor MTC Panel (カタログ番号：K1422-1) を用いて、MDTS9遺伝子の組織発現分布を以下の手順で解析した。

すなわち、配列番号15で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号16で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーとし、前記cDNAパネルを鑄型として、DNAポリメラーゼ (Takara LA Taq<sup>TM</sup>；宝酒造社製) を用いてPCRを行なった。前記PCRでは、最初に94°C (2分間) で熱変性を行なった後、98°C (10秒間) と6

8°C (1分30秒間) とからなるサイクルを44回繰り返した。続いて、反応液のアガロースゲル電気泳動を行ない、MDTS9遺伝子のmRNAに由来する約1.1kbのDNA断片を検出した。その結果、MDTS9遺伝子のmRNAは、腎臓に発現していることが判明した。

#### 実施例6：TGF-βによるMDTS9遺伝子の発現誘導

##### (1) 鑄型cDNAの調製

6穴プレート（旭テクノグラス社製）に正常ヒト腎臓近位尿細管上皮細胞 [クロネクス (Clonetechs) 社製] を $5 \times 10^5$ 個となるように撒き、腎上皮細胞培地キット（クロネクス社製）で1日間培養した。無血清の腎上皮細胞培地に変換し、更に1日間培養した後、TGF-β1（シグマ社製）を終濃度10ng/mlとなるように添加した無血清の腎上皮細胞培地に交換し、24時間培養した。なお、対照群は、TGF-β1を添加していない無血清の腎上皮細胞培地に交換し、24時間培養した。

各処理群から、それぞれ、市販の総RNA精製試薬 (ISOGEN; 日本ジーン社製) を用いて総RNAを調製した。得られた総RNAをDNアーゼ（日本ジーン社製）を用いて、37°Cで90分間反応させた。DNアーゼ処理した総RNA 0.5μgをスーパースクリプト・ファーストストランドシステム (RT-PCR用) (GIBCO-BRL社製) を用いてcDNAに変換した。

##### (2) 定量PCRによるMDTS9遺伝子のmRNAの定量

正常ヒト腎臓近位尿細管上皮細胞での発現変動解析は、前記実施例6(1)で調製したcDNAを鑄型として、シーケンスディテクター (Prism7700 Sequence Detector; アプライドバイオシステムズ社製) を用いて行なった。なお、プライマーセットとしては、配列番号17で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号18で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせを使用した。また、PCRは、市販のPCR試薬 (SYBR Green PCR core reagent; アプライド・バイオシステムズ社製) を用い、95°C (10分間) の初期変性反応を実施した後、94°C (15秒間) と60°C (30秒間) と72°C (60秒間) とかなるサイクル反応を40回繰り返すことにより実施した。

なお、内部標準としてヒト $\beta$ アクチンの遺伝子発現量を算出するために、前記cDNAを鑄型とし、配列番号19で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号20で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーセットとし、同条件のPCRを行なった。また、mRNA発現量算出の標準曲線を得るために、前記実施例6(1)で調製したTGF- $\beta$ 1無刺激のヒト腎臓近位尿細管上皮細胞cDNAを鑄型とし、前記プライマーセット(すなわち、配列番号17で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号18で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせ、あるいは、配列番号19で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号20で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせ)を用いて同条件のPCRを行なった。一定量の総RNA当たりのMDTS9遺伝子のmRNAの発現量を得るため、各条件でのMDTS9遺伝子のmRNAの発現量は、各条件での $\beta$ アクチン遺伝子発現量に対する割合で示した。その結果、MDTS9遺伝子のmRNAは、TGF- $\beta$ 1により、約8倍に遺伝子発現誘導されることが判明した。

#### 実施例7：ラット腎不全モデルにおけるMDTS9遺伝子の発現変動

##### (1) 鑄型cDNAの調製

cDNAの調製は、ラット5/6腎摘モデル(木村健二郎、「腎と透析」1991臨時増刊号、431-439)の腎臓より調製した。5/6腎摘終了後、1週、2週、3週、4週、6週、8週、及び10週に、5/6腎摘ラット及び偽手術ラットを各々5匹ずつ解剖し、腎臓を摘出し、その後直ちに-80°Cにて凍結保存した。これら各群の腎臓を液体窒素凍結下、細胞破碎機(クライオプレスCP-100；マイクロテック・ニチオン社製)を用いて破碎後、総RNA精製試薬(ISOGEN；日本ジーン社製)を用いて総RNAを調製した。抽出した総RNAをDNアーゼ(ニッポンジーン社製)を用い、37°Cで90分間反応させた。DNアーゼ処理した総RNA 0.25 $\mu$ gをスーパースクリプトIIファーストストランドシステム(RT-PCR用)(GIBCO-BRL社製)にてcDNAに変換した。

##### (2) 定量PCRによるラットMDTS9カウンターパートのmRNAの定量

ラット腎不全モデルにおける腎臓での発現変動解析は、実施例7(1)で調製したcDNAを鑄型にして、シークエンスディテクター(Prism 7700 Sequence Detector; アプライドバイオシステムズ社製)を用いて行なった。配列番号23で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号24で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとを、プライマーセットとして用いた。PCRは、市販のPCR試薬[サイバーグリーンPCRコアリエージェント(SYBR Green PCR core reagent); アプライドバイオシステムズ社製]を用い、95°C(10分間)の初期変性反応を実施した後、94°C(15秒間)と60°C(30秒間)と72°C(60秒間)とからなるサイクル反応を45回繰り返すことにより実施した。

また、内部標準としてヒトグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(G3PDH)の遺伝子発現量を算出するため、前記cDNAを鑄型として、配列番号25で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号26で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとを、プライマーセットとして同条件のPCRを行なった。更に、mRNA発現量算出に用いる標準曲線を得るために、ラットゲノムDNA(クロンテック社製)を鑄型として、前記プライマーセットを用いて同条件のPCRを行なった。各群における一定量の総RNA当たりのラットMDTS9遺伝子のmRNAの発現量を比較するため、各条件でのラットMDTS9遺伝子のmRNAの発現量は、各条件でのG3PDH遺伝子発現量に対する割合で示した。その結果、ラットMDTS9遺伝子のmRNAは、5/6腎摘モデルにおいて、偽手術ラットに比べ、術後1週で約5倍の遺伝子が発現しており、尿タンパク質量が顕著に増加する術後3週、正常腎重量と比べ著明に腎重量が増加し始める術後6週、更に病態が悪化する術後8週で、それぞれ、約2倍の遺伝子が発現していることが判明した。

本実施例により、腎不全モデルでは、MDTS9の遺伝子が発現誘導されることが明らかとなった。

#### 実施例8：ヒト腎臓組織切片の免疫組織染色

##### (1) 抗ヒトMDTS9抗体の作製

まず、実験解説書(岡田雅人及び宮崎香編、「改訂タンパク質実験ノート」上、

羊土社, p. 162-179) ] に準じて、プラスミド pGEX-6P-1 (アマシャムファルマシアバイオテク社製) を発現ベクターとして用い、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 280 番～第 410 番のアミノ酸からなるペプチドと、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質 (GST-MDTs9A) を、大腸菌を用いて封入体画分に生産した。続いて、封入体画分について、調製用 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を実施し、ゲルから拡散法によって目的の GST-MDTs9A タンパク質を抽出した (岡田雅人及び宮崎香編, 「改訂タンパク質実験ノート」下, 羊土社, p. 48-51)。

得られた GST-MDTs9A タンパク質を、ウサギ (日本白色種) に 10～14 日間隔で計 5 回免疫した後、抗血清を調製した。この抗血清より、まず 1 g G 画分をプロテイン G セファロース FF カラム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) でアフィニティー精製し、続いて、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 280 番～第 410 番のアミノ酸からなるペプチドと、マンノース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質 (MBP-MDTs9A) を固定したカラム (MBP-MDTs9A カラム) でアフィニティー精製を行ない、抗ヒト MDTs9 抗体とした。プロテイン G セファロース FF カラムでのアフィニティー精製、並びに CNBr 活性化セファロース FF カラム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) への MBP-MDTs9A の固定及び MBP-MDTs9A カラムでのアフィニティー精製は、添付説明書に従った。また、 MBP-MDTs9A の大腸菌での生産及び精製は、 pMAL-c2E (ニュー・イングランド・バイオラボ社製) を発現ベクターとして用い、同社の「pMAL 蛋白融合及び精製システム」の指示書に従った。

## (2) ヒト腎臓での MDTs9 タンパク質の検出

スライドガラス上にホルマリン固定及びパラフィン包埋した組織切片に、実施例 8 (1) で調製した抗ヒト MDTs9 抗体を反応させた後、市販の染色キット (ベクタステイン ABC-AP キット, カタログ番号 AK-5000; ベクター社製) を用いて、添付説明書に従い、染色した。その際、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ抗体 (カタログ番号 BA-1000; ベクター社製) 、発色基質

としてアルカリリフォスファターゼ基質キットI（カタログ番号SK-5100；ベクター社製）を用いた。その結果、健常人及び糖尿病性腎症（初期又は後期）患者の腎臓において、上皮細胞、中でも特に糸球体上皮細胞（podocytes）での染色が認められた。

本実施例から、MDTS9タンパク質がヒト腎臓で発現していることが明らかである。

### 産業上の利用可能性

本発明のポリペプチドは、TGF- $\beta$ により誘導され、細胞外マトリクスの代謝に関与する、腎臓に発現している新規プロテアーゼであるので、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質は、TGF- $\beta$ の生理作用のうち、細胞外マトリクス成分の質的変化及び量的増加に係わる部分だけを抑制又は阻害する可能性が高く、長期投与が想定される慢性腎不全治療剤として有用である。すなわち、本発明のポリペプチドによれば、慢性腎不全治療剤の簡便なスクリーニング系を提供することができる。また、本発明のポリヌクレオチド、発現ベクター、細胞、及び抗体は、本発明のポリペプチドを製造するのに有用である。

### 配列表フリーテキスト

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号3及び4の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したリンカ一配列である。また、配列表の配列番号5～9及び12～14の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。更に、配列表の配列番号21の配列で表されるアミノ酸配列は、制限酵素NotI認識ヌクレオチド配列及びFLAGタグアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むDNAの発現により得られるアミノ酸配列である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

## 請求の範囲

1. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列、あるいは、(3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド。
2. 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド。
3. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド。
4. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列との相同性が、90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド。
5. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列との相同性が、90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド。
6. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる、あるいは、(3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における

第1番～第1224番のアミノ酸からなるポリペプチド。

7. 請求項1～6のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

8. 請求項7に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

9. 請求項8に記載の発現ベクターでトランスフェクションされた細胞。

10. 請求項1～6のいずれか一項に記載のポリペプチドに結合する抗体又はその断片。

11. 請求項9に記載の細胞を培養し、請求項1～6のいずれか一項に記載のポリペプチドを回収することを含む、請求項1～6のいずれか一項に記載のポリペプチドの製造方法。

12. (1) 請求項1～6のいずれか一項に記載のポリペプチドと、(2)  $\alpha_2$ -マクログロブリンと、(3) 試験化合物とを接触させる工程、及び前記ポリペプチドと  $\alpha_2$ -マクログロブリンとが、SDS及び／又は還元剤では解離しない複合体を形成するか否かを分析する工程

を含む、試験化合物が前記ポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害するか否かを検出する方法。

13. 請求項12に記載の方法による検出工程、及びプロテアーゼ活性を阻害する物質を選択する工程

を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載のポリペプチドのプロテアーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法。

14. 請求項13に記載の方法により、慢性腎不全治療用物質をスクリーニングする方法。

15. 請求項12に記載の方法による検出工程、及び製剤化工程

を含む、慢性腎不全治療用医薬組成物の製造方法。

## SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Novel protease

<130> Y0132PCT-664

<150> JP 2000-393372

<151> 2000-12-25

<160> 26

<210> 1

<211> 3675

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3675)

<400> 1

atg aag ccc cgc gcg cgc gga tgg cgg ggc ttg gcg gcg ctg tgg atg 48  
Met Lys Pro Arg Ala Arg Gly Trp Arg Gly Leu Ala Ala Leu Trp Met  
1 5 10 15

ctg ttg gcg cag gtg gcc gag cag gca cct gcg tgc gcc atg gga ccc 96  
Leu Leu Ala Gln Val Ala Glu Gln Ala Pro Ala Cys Ala Met Gly Pro  
20 25 30

gca gcg gca gcg cct ggg agc ccg agc gtc ccg cgt cct cct cca ccc 144  
Ala Ala Ala Ala Pro Gly Ser Pro Ser Val Pro Arg Pro Pro Pro Pro  
35 40 45

gcg gag cgg ccg ggc tgg atg gaa aag ggc gaa tat gac ctg gtc tct 192  
Ala Glu Arg Pro Gly Trp Met Glu Lys Gly Glu Tyr Asp Leu Val Ser  
50 55 60

gcc tac gag gtt gac cac agg ggc gat tac gtg tcc cat gaa atc atg 240  
Ala Tyr Glu Val Asp His Arg Gly Asp Tyr Val Ser His Glu Ile Met  
65 70 75 80

cac cat cag cgg cgg aga aga gca gtg gcc gtg tcc gag gtt gag tct 288  
His His Gln Arg Arg Arg Ala Val Ala Val Ser Glu Val Glu Ser  
85 90 95

ctt cac ctt cgg ctg aaa ggc tcc agg cac gac ttc cac gtg gat ctg	336
Leu His Leu Arg Leu Lys Gly Ser Arg His Asp Phe His Val Asp Leu	
100 105 110	
agg act tcc agc agc cta gtg gct cct ggc ttt att gtg cag acg ttg	384
Arg Thr Ser Ser Leu Val Ala Pro Gly Phe Ile Val Gln Thr Leu	
115 120 125	
gga aag aca ggc act aag tct gtg cag act tta ccg cca gag gac ttc	432
Gly Lys Thr Gly Thr Lys Ser Val Gln Thr Leu Pro Pro Glu Asp Phe	
130 135 140	
tgt ttc tat caa ggc tct ttg cga tca cac aga aac tcc tca gtg gcc	480
Cys Phe Tyr Gln Gly Ser Leu Arg Ser His Arg Asn Ser Ser Val Ala	
145 150 155 160	
ctt tca acc tgc caa ggc ttg tca ggc atg ata cga aca gaa gag gca	528
Leu Ser Thr Cys Gln Gly Leu Ser Gly Met Ile Arg Thr Glu Glu Ala	
165 170 175	
gat tac ttc cta agg cca ctt cct tca cac ctc tca tgg aaa ctc ggc	576
Asp Tyr Phe Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Leu Ser Trp Lys Leu Gly	
180 185 190	
aga gct gcc caa ggc agc tcg cca tcc cac gta ctg tac aag aga tcc	624
Arg Ala Ala Gln Gly Ser Ser Pro Ser His Val Leu Tyr Lys Arg Ser	
195 200 205	
aca gag ccc cat gct cct ggg gcc agt gag gtc ctg gtg acc tca agg	672
Thr Glu Pro His Ala Pro Gly Ala Ser Glu Val Leu Val Thr Ser Arg	
210 215 220	
aca tgg gag ctg gca cat caa ccc ctg cac agc agc gac ctt cgc ctg	720
Thr Trp Glu Leu Ala His Gln Pro Leu His Ser Ser Asp Leu Arg Leu	
225 230 235 240	
gga ctg cca caa aag cag cat ttc tgt gga aga cgc aag aaa tac atg	768
Gly Leu Pro Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg Arg Lys Lys Tyr Met	
245 250 255	
ccc cag cct ccc aag gaa gac ctc ttc atc ttg cca gat gag tat aag	816
Pro Gln Pro Pro Lys Glu Asp Leu Phe Ile Leu Pro Asp Glu Tyr Lys	
260 265 270	
tct tgc tta cgg cat aag cgc tct ctt ctg agg tcc cat aga aat gaa	864

Ser	Cys	Leu	Arg	His	Lys	Arg	Ser	Leu	Leu	Arg	Ser	His	Arg	Asn	Glu	
275		280			285											
gaa ctg aac gtg gag acc ttg gtg gtc gac aaa aag atg atg caa															912	
Glu	Leu	Asn	Val	Glu	Thr	Leu	Val	Val	Val	Asp	Lys	Lys	Met	Met	Gln	
290		295			300											
aac	cat	ggc	cat	gaa	aat	atc	acc	acc	tac	gtg	ctc	acg	ata	ctc	aac	
Asn	His	Gly	His	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Tyr	Val	Leu	Thr	Ile	Leu	Asn	
305		310			315								320			
atg	gta	tct	gct	tta	ttc	aaa	gat	gga	aca	ata	gga	gga	aac	atc	aac	
Met	Val	Ser	Ala	Leu	Phe	Lys	Asp	Gly	Thr	Ile	Gly	Gly	Asn	Ile	Asn	
325					330					335						
att	gca	att	gta	ggt	ctg	att	ctt	cta	gaa	gat	gaa	cag	cca	gga	ctg	
Ile	Ala	Ile	Val	Gly	Leu	Ile	Leu	Leu	Glu	Asp	Glu	Gln	Pro	Gly	Leu	
340					345					350						
gtg	ata	agt	cac	cac	gca	gac	cac	acc	tta	agt	agc	ttc	tgc	cag	tgg	
Val	Ile	Ser	His	His	Ala	Asp	His	Thr	Leu	Ser	Ser	Phe	Cys	Gln	Trp	
355					360					365						
cag	tct	gga	ttg	atg	ggg	aaa	gat	ggg	act	cgt	cat	gac	cac	gcc	atc	
Gln	Ser	Gly	Leu	Met	Gly	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	His	Asp	His	Ala	Ile	
370					375					380						
tta	ctg	act	ggt	ctg	gat	ata	tgt	tcc	tgg	aag	aat	gag	ccc	tgt	gac	
Leu	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Ile	Cys	Ser	Trp	Lys	Asn	Glu	Pro	Cys	Asp	
385					390					395			400			
act	ttg	gga	ttt	gca	ccc	ata	agt	gga	atg	tgt	agt	aaa	tat	cgc	agc	
Thr	Leu	Gly	Phe	Ala	Pro	Ile	Ser	Gly	Met	Cys	Ser	Lys	Tyr	Arg	Ser	
405						410						415				
tgc	acg	att	aat	gaa	gat	aca	ggt	ctt	gga	ctg	gcc	ttc	acc	att	gcc	
Cys	Thr	Ile	Asn	Glu	Asp	Thr	Gly	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe	Thr	Ile	Ala	
420					425						430					
cat	gag	tct	gga	cac	aac	ttt	ggc	atg	att	cat	gat	gga	gaa	ggg	aac	
His	Glu	Ser	Gly	His	Asn	Phe	Gly	Met	Ile	His	Asp	Gly	Glu	Gly	Asn	
435					440					445						
atg	tgt	aaa	aag	tcc	gag	ggc	aac	atc	atg	tcc	cct	aca	ttg	gca	gga	
Met	Cys	Lys	Ser	Glu	Gly	Asn	Ile	Met	Ser	Pro	Thr	Leu	Ala	Gly		
450					455					460						

cgc aat gga gtc ttc tcc tgg tca ccc tgc agc cgc cag tat cta cac	465	470	475	480	1440
Arg Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Gln Tyr Leu His					
aaa ttt cta agc acc gct caa gct atc tgc ctt gct gat cag cca aag	485	490	495		1488
Lys Phe Leu Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala Asp Gln Pro Lys					
cct gtg aag gaa tac aag tat cct gag aaa ttg cca gga gaa tta tat	500	505	510		1536
Pro Val Lys Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro Gly Glu Leu Tyr					
gat gca aac aca cag tgc aag tgg cag ttc gga gag aaa gcc aag ctc	515	520	525		1584
Asp Ala Asn Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu Lys Ala Lys Leu					
tgc atg ctg gac ttt aaa aag gac atc tgt aaa gcc ctg tgg tgc cat	530	535	540		1632
Cys Met Leu Asp Phe Lys Lys Asp Ile Cys Lys Ala Leu Trp Cys His					
cgt att gga agg aaa tgt gag act aaa ttt atg cca gca gca gaa ggc	545	550	555	560	1680
Arg Ile Gly Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly					
aca att tgt ggg cat gac atg tgg tgc cgg gga gga cag tgt gtg aaa	565	570	575		1728
Thr Ile Cys Gly His Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly Gln Cys Val Lys					
tat ggt gat gaa ggc ccc aag ccc acc cat ggc cac tgg tcg gac tgg	580	585	590		1776
Tyr Gly Asp Glu Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His Trp Ser Asp Trp					
tct tct tgg tcc cca tgc tcc agg acc tgc gga ggg gga gta tct cat	595	600	605		1824
Ser Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Val Ser His					
agg agt cgc ctc tgc acc aac ccc aag cca tcg cat gga ggg aag ttc	610	615	620		1872
Arg Ser Arg Leu Cys Thr Asn Pro Lys Pro Ser His Gly Gly Lys Phe					
tgt gag ggc tcc act cgc act ctg aag ctc tgc aac agt cag aaa tgt	625	630	635	640	1920
Cys Glu Gly Ser Thr Arg Thr Leu Lys Leu Cys Asn Ser Gln Lys Cys					
ccc cgg gac agt gtt gac ttc cgt gct gct cag tgt gcc gag cac aac					1968

Pro Arg Asp Ser Val Asp Phe Arg Ala Ala Gln Cys Ala Glu His Asn			
645	650	655	
agc aga cga ttc aga ggg cg <sup>g</sup> cac tac aag tgg aag cct tac act caa			2016
Ser Arg Arg Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys Trp Lys Pro Tyr Thr Gln			
660	665	670	
gta gaa gat cag gac tta tgc aaa ctc tac tgt atc gca gaa gga ttt			2064
Val Glu Asp Gln Asp Leu Cys Lys Leu Tyr Cys Ile Ala Glu Gly Phe			
675	680	685	
gat ttc ttc ttt tct ttg tca aat aaa gtc aaa gat ggg act cca tgc			2112
Asp Phe Phe Phe Ser Leu Ser Asn Lys Val Lys Asp Gly Thr Pro Cys			
690	695	700	
tcg gag gat agc cgt aat gtt tgt ata gat ggg ata tgt gag aga gtt			2160
Ser Glu Asp Ser Arg Asn Val Cys Ile Asp Gly Ile Cys Glu Arg Val			
705	710	715	720
gga tgt gac aat gtc ctt gga tct gat gct gtt gaa gac gtc tgt ggg			2208
Gly Cys Asp Asn Val Leu Gly Ser Asp Ala Val Glu Asp Val Cys Gly			
725	730	735	
gtg tgt aac ggg aat aac tca gcc tgc acg att cac agg ggt ctc tac			2256
Val Cys Asn Gly Asn Asn Ser Ala Cys Thr Ile His Arg Gly Leu Tyr			
740	745	750	
acc aag cac cac acc aac cag tat tat cac atg gtc acc att cct			2304
Thr Lys His His Thr Asn Gln Tyr Tyr His Met Val Thr Ile Pro			
755	760	765	
tct gga gcc cgg agt atc cgc atc tat gaa atg aac gtc tct acc tcc			2352
Ser Gly Ala Arg Ser Ile Arg Ile Tyr Glu Met Asn Val Ser Thr Ser			
770	775	780	
tac att tct gtg cgc aat gcc ctc aga agg tac tac ctg aat ggg cac			2400
Tyr Ile Ser Val Arg Asn Ala Leu Arg Arg Tyr Tyr Leu Asn Gly His			
785	790	795	800
tgg acc gtg gac tgg ccc ggc cg <sup>g</sup> tac aaa ttt tcg ggc act act ttc			2448
Trp Thr Val Asp Trp Pro Gly Arg Tyr Lys Phe Ser Gly Thr Thr Phe			
805	810	815	
gac tac aga cgg tcc tat aat gag ccc gag aac tta atc gct act gga			2496
Asp Tyr Arg Arg Ser Tyr Asn Glu Pro Glu Asn Leu Ile Ala Thr Gly			
820	825	830	

cca acc aac gag aca ctg att gtg gag ctg ctg ttt cag gga agg aac	835	840	845	2544
Pro Thr Asn Glu Thr Leu Ile Val Glu Leu Leu Phe Gln Gly Arg Asn				
cgc ggt gtt gcc tgg gaa tac tcc atg cct cgc ttg ggg acc gag aag	850	855	860	2592
Pro Gly Val Ala Trp Glu Tyr Ser Met Pro Arg Leu Gly Thr Glu Lys				
cag ccc cct gcc cag ccc agc tac act tgg gcc atc gtg cgc tct gag	865	870	875	2640
Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ser Tyr Thr Trp Ala Ile Val Arg Ser Glu				
tgc tcc gtg tcc tgc gga ggg gga cag atg acc gtg aga gag ggc tgc	885	890	895	2688
Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gln Met Thr Val Arg Glu Gly Cys				
tac aga gac ctg aag ttt caa gta aat atg tcc ttc tgc aat ccc aag	900	905	910	2736
Tyr Arg Asp Leu Lys Phe Gln Val Asn Met Ser Phe Cys Asn Pro Lys				
aca cga cct gtc acg ggg ctg gtg cct tgc aaa gta tct gcc tgt cct	915	920	925	2784
Thr Arg Pro Val Thr Gly Leu Val Pro Cys Lys Val Ser Ala Cys Pro				
ccc agc tgg tcc gtg ggg aac tgg agt gcc tgc agt cgg acg tgt ggc	930	935	940	2832
Pro Ser Trp Ser Val Gly Asn Trp Ser Ala Cys Ser Arg Thr Cys Gly				
ggg ggt gcc cag agc cgc ccc gtg cag tgc aca cgg cgg gtg cac tat	945	950	955	2880
Gly Gly Ala Gln Ser Arg Pro Val Gln Cys Thr Arg Arg Val His Tyr				
gac tcg gag cca gtc ccg gcc agc ctg tgc cct cag cct gct ccc tcc	965	970	975	2928
Asp Ser Glu Pro Val Pro Ala Ser Leu Cys Pro Gln Pro Ala Pro Ser				
agc agg cag gcc tgc aac tct cag agc tgc cca cct gca tgg agc gcc	980	985	990	2976
Ser Arg Gln Ala Cys Asn Ser Gln Ser Cys Pro Pro Ala Trp Ser Ala				
ggg ccc tgg gca gag tgc tca cac acc tgt ggg aag ggg tgg agg aag	995	1000	1005	3024
Gly Pro Trp Ala Glu Cys Ser His Thr Cys Gly Lys Gly Trp Arg Lys				
cggt gca gtg gcc tgt aag agc acc aac ccc tcg gcc aga gct cag ctg				3072

Arg Ala Val Ala Cys Lys Ser Thr Asn Pro Ser Ala Arg Ala Gln Leu			
1010	1015	1020	
ctg ccc gac gct gtc tgc acc tcc gag ccc aag ccc agg atg cat gaa			3120
Leu Pro Asp Ala Val Cys Thr Ser Glu Pro Lys Pro Arg Met His Glu			
1025	1030	1035	1040
gcc tgt ctg ctt cag cgc tgc cac aag ccc aag aag ctg cag tgg ctg			3168
Ala Cys Leu Leu Gln Arg Cys His Lys Pro Lys Lys Leu Gln Trp Leu			
1045	1050	1055	
gtg tcc gcc tgg tcc cag tgc tct gtg aca tgt gaa aga gga aca cag			3216
Val Ser Ala Trp Ser Gln Cys Ser Val Thr Cys Glu Arg Gly Thr Gln			
1060	1065	1070	
aaa aga ttc tta aaa tgt gct gaa aag tat gtt tct gga aag tat cga			3264
Lys Arg Phe Leu Lys Cys Ala Glu Lys Tyr Val Ser Gly Lys Tyr Arg			
1075	1080	1085	
gag ctg gcc tca aag aag tgc tca cat ttg ccg aag ccc agc ctg gag			3312
Glu Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ser His Leu Pro Lys Pro Ser Leu Glu			
1090	1095	1100	
ctg gaa cgt gcc tgc gcc ccg ctt cca tgc ccc agg cac ccc cca ttt			3360
Leu Glu Arg Ala Cys Ala Pro Leu Pro Cys Pro Arg His Pro Pro Phe			
1105	1110	1115	1120
gct gct gcg gga ccc tcg agg ggc agc tgg ttt gcc tca ccc tgg tct			3408
Ala Ala Ala Gly Pro Ser Arg Gly Ser Trp Phe Ala Ser Pro Trp Ser			
1125	1130	1135	
cag tgc acg gcc agc tgt ggg gga ggc gtt cag acg agg tcc gtg cag			3456
Gln Cys Thr Ala Ser Cys Gly Gly Val Gln Thr Arg Ser Val Gln			
1140	1145	1150	
tgc ctg gct ggg ggc cgg gcc tca ggc tgc ctc ctg cac cag aag			3504
Cys Leu Ala Gly Gly Arg Pro Ala Ser Gly Cys Leu Leu His Gln Lys			
1155	1160	1165	
cct tcg gcc tcc ctg gcc tgc aac act cac ttc tgc ccc att gca gag			3552
Pro Ser Ala Ser Leu Ala Cys Asn Thr His Phe Cys Pro Ile Ala Glu			
1170	1175	1180	
aag aaa gat gcc ttc tgc aaa gac tac ttc cac tgg tgc tac ctg gta			3600
Lys Lys Asp Ala Phe Cys Lys Asp Tyr Phe His Trp Cys Tyr Leu Val			
1185	1190	1195	1200

ccc cag cac ggg atg tgc agc cac aag ttc tac ggc aag cag tgc tgc 3648  
 Pro Gln His Gly Met Cys Ser His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys  
 1205 1210 1215

aag act tgc tct aag tcc aac ttg tga 3675  
 Lys Thr Cys Ser Lys Ser Asn Leu  
 1220 1225

<210> 2  
 <211> 1224  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Lys Pro Arg Ala Arg Gly Trp Arg Gly Leu Ala Ala Leu Trp Met  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Ala Gln Val Ala Glu Gln Ala Pro Ala Cys Ala Met Gly Pro  
 20 25 30  
 Ala Ala Ala Ala Pro Gly Ser Pro Ser Val Pro Arg Pro Pro Pro  
 35 40 45  
 Ala Glu Arg Pro Gly Trp Met Glu Lys Gly Glu Tyr Asp Leu Val Ser  
 50 55 60  
 Ala Tyr Glu Val Asp His Arg Gly Asp Tyr Val Ser His Glu Ile Met  
 65 70 75 80  
 His His Gln Arg Arg Arg Arg Ala Val Ala Val Ser Glu Val Glu Ser  
 85 90 95  
 Leu His Leu Arg Leu Lys Gly Ser Arg His Asp Phe His Val Asp Leu  
 100 105 110  
 Arg Thr Ser Ser Leu Val Ala Pro Gly Phe Ile Val Gln Thr Leu  
 115 120 125  
 Gly Lys Thr Gly Thr Lys Ser Val Gln Thr Leu Pro Pro Glu Asp Phe  
 130 135 140  
 Cys Phe Tyr Gln Gly Ser Leu Arg Ser His Arg Asn Ser Ser Val Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Ser Thr Cys Gln Gly Leu Ser Gly Met Ile Arg Thr Glu Glu Ala  
 165 170 175  
 Asp Tyr Phe Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Leu Ser Trp Lys Leu Gly  
 180 185 190  
 Arg Ala Ala Gln Gly Ser Ser Pro Ser His Val Leu Tyr Lys Arg Ser  
 195 200 205  
 Thr Glu Pro His Ala Pro Gly Ala Ser Glu Val Leu Val Thr Ser Arg  
 210 215 220  
 Thr Trp Glu Leu Ala His Gln Pro Leu His Ser Ser Asp Leu Arg Leu  
 225 230 235 240

Gly Leu Pro Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg Arg Lys Lys Tyr Met  
 245 250 255  
 Pro Gln Pro Pro Lys Glu Asp Leu Phe Ile Leu Pro Asp Glu Tyr Lys  
 260 265 270  
 Ser Cys Leu Arg His Lys Arg Ser Leu Leu Arg Ser His Arg Asn Glu  
 275 280 285  
 Glu Leu Asn Val Glu Thr Leu Val Val Asp Lys Lys Met Met Gln  
 290 295 300  
 Asn His Gly His Glu Asn Ile Thr Thr Tyr Val Leu Thr Ile Leu Asn  
 305 310 315 320  
 Met Val Ser Ala Leu Phe Lys Asp Gly Thr Ile Gly Gly Asn Ile Asn  
 325 330 335  
 Ile Ala Ile Val Gly Leu Ile Leu Leu Glu Asp Glu Gln Pro Gly Leu  
 340 345 350  
 Val Ile Ser His His Ala Asp His Thr Leu Ser Ser Phe Cys Gln Trp  
 355 360 365  
 Gln Ser Gly Leu Met Gly Lys Asp Gly Thr Arg His Asp His Ala Ile  
 370 375 380  
 Leu Leu Thr Gly Leu Asp Ile Cys Ser Trp Lys Asn Glu Pro Cys Asp  
 385 390 395 400  
 Thr Leu Gly Phe Ala Pro Ile Ser Gly Met Cys Ser Lys Tyr Arg Ser  
 405 410 415  
 Cys Thr Ile Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly Leu Ala Phe Thr Ile Ala  
 420 425 430  
 His Glu Ser Gly His Asn Phe Gly Met Ile His Asp Gly Glu Gly Asn  
 435 440 445  
 Met Cys Lys Ser Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro Thr Leu Ala Gly  
 450 455 460  
 Arg Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Gln Tyr Leu His  
 465 470 475 480  
 Lys Phe Leu Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala Asp Gln Pro Lys  
 485 490 495  
 Pro Val Lys Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro Gly Glu Leu Tyr  
 500 505 510  
 Asp Ala Asn Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu Lys Ala Lys Leu  
 515 520 525  
 Cys Met Leu Asp Phe Lys Lys Asp Ile Cys Lys Ala Leu Trp Cys His  
 530 535 540  
 Arg Ile Gly Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly  
 545 550 555 560  
 Thr Ile Cys Gly His Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly Gln Cys Val Lys  
 565 570 575  
 Tyr Gly Asp Glu Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His Trp Ser Asp Trp  
 580 585 590  
 Ser Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Val Ser His  
 595 600 605

10/17

Arg Ser Arg Leu Cys Thr Asn Pro Lys Pro Ser His Gly Gly Lys Phe  
 610 615 620  
 Cys Glu Gly Ser Thr Arg Thr Leu Lys Leu Cys Asn Ser Gln Lys Cys  
 625 630 635 640  
 Pro Arg Asp Ser Val Asp Phe Arg Ala Ala Gln Cys Ala Glu His Asn  
 645 650 655  
 Ser Arg Arg Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys Trp Lys Pro Tyr Thr Gln  
 660 665 670  
 Val Glu Asp Gln Asp Leu Cys Lys Leu Tyr Cys Ile Ala Glu Gly Phe  
 675 680 685  
 Asp Phe Phe Phe Ser Leu Ser Asn Lys Val Lys Asp Gly Thr Pro Cys  
 690 695 700  
 Ser Glu Asp Ser Arg Asn Val Cys Ile Asp Gly Ile Cys Glu Arg Val  
 705 710 715 720  
 Gly Cys Asp Asn Val Leu Gly Ser Asp Ala Val Glu Asp Val Cys Gly  
 725 730 735  
 Val Cys Asn Gly Asn Asn Ser Ala Cys Thr Ile His Arg Gly Leu Tyr  
 740 745 750  
 Thr Lys His His His Thr Asn Gln Tyr Tyr His Met Val Thr Ile Pro  
 755 760 765  
 Ser Gly Ala Arg Ser Ile Arg Ile Tyr Glu Met Asn Val Ser Thr Ser  
 770 775 780  
 Tyr Ile Ser Val Arg Asn Ala Leu Arg Arg Tyr Tyr Leu Asn Gly His  
 785 790 795 800  
 Trp Thr Val Asp Trp Pro Gly Arg Tyr Lys Phe Ser Gly Thr Thr Phe  
 805 810 815  
 Asp Tyr Arg Arg Ser Tyr Asn Glu Pro Glu Asn Leu Ile Ala Thr Gly  
 820 825 830  
 Pro Thr Asn Glu Thr Leu Ile Val Glu Leu Leu Phe Gln Gly Arg Asn  
 835 840 845  
 Pro Gly Val Ala Trp Glu Tyr Ser Met Pro Arg Leu Gly Thr Glu Lys  
 850 855 860  
 Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ser Tyr Thr Trp Ala Ile Val Arg Ser Glu  
 865 870 875 880  
 Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gln Met Thr Val Arg Glu Gly Cys  
 885 890 895  
 Tyr Arg Asp Leu Lys Phe Gln Val Asn Met Ser Phe Cys Asn Pro Lys  
 900 905 910  
 Thr Arg Pro Val Thr Gly Leu Val Pro Cys Lys Val Ser Ala Cys Pro  
 915 920 925  
 Pro Ser Trp Ser Val Gly Asn Trp Ser Ala Cys Ser Arg Thr Cys Gly  
 930 935 940  
 Gly Gly Ala Gln Ser Arg Pro Val Gln Cys Thr Arg Arg Val His Tyr  
 945 950 955 960  
 Asp Ser Glu Pro Val Pro Ala Ser Leu Cys Pro Gln Pro Ala Pro Ser  
 965 970 975

Ser Arg Gln Ala Cys Asn Ser Gln Ser Cys Pro Pro Ala Trp Ser Ala  
 980 985 990  
 Gly Pro Trp Ala Glu Cys Ser His Thr Cys Gly Lys Gly Trp Arg Lys  
 995 1000 1005  
 Arg Ala Val Ala Cys Lys Ser Thr Asn Pro Ser Ala Arg Ala Gln Leu  
 1010 1015 1020  
 Leu Pro Asp Ala Val Cys Thr Ser Glu Pro Lys Pro Arg Met His Glu  
 1025 1030 1035 1040  
 Ala Cys Leu Leu Gln Arg Cys His Lys Pro Lys Lys Leu Gln Trp Leu  
 1045 1050 1055  
 Val Ser Ala Trp Ser Gln Cys Ser Val Thr Cys Glu Arg Gly Thr Gln  
 1060 1065 1070  
 Lys Arg Phe Leu Lys Cys Ala Glu Lys Tyr Val Ser Gly Lys Tyr Arg  
 1075 1080 1085  
 Glu Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ser His Leu Pro Lys Pro Ser Leu Glu  
 1090 1095 1100  
 Leu Glu Arg Ala Cys Ala Pro Leu Pro Cys Pro Arg His Pro Pro Phe  
 1105 1110 1115 1120  
 Ala Ala Ala Gly Pro Ser Arg Gly Ser Trp Phe Ala Ser Pro Trp Ser  
 1125 1130 1135  
 Gln Cys Thr Ala Ser Cys Gly Gly Val Gln Thr Arg Ser Val Gln  
 1140 1145 1150  
 Cys Leu Ala Gly Gly Arg Pro Ala Ser Gly Cys Leu Leu His Gln Lys  
 1155 1160 1165  
 Pro Ser Ala Ser Leu Ala Cys Asn Thr His Phe Cys Pro Ile Ala Glu  
 1170 1175 1180  
 Lys Lys Asp Ala Phe Cys Lys Asp Tyr Phe His Trp Cys Tyr Leu Val  
 1185 1190 1195 1200  
 Pro Gln His Gly Met Cys Ser His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys  
 1205 1210 1215  
 Lys Thr Cys Ser Lys Ser Asn Leu  
 1220

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized linker sequence

&lt;400&gt; 3

ctagcgcggc cgccaggatcc gactacaagg acgacgtatca caaatgataa

50

<210> 4  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized linker sequence

<400> 4  
gatcttatca tttgtcatcg tcgtccttgt agtcggatcc tgcggccgcg

50

<210> 5  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 5  
ggactagtct agaagctggg taccagctgc tagc

34

<210> 6  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 6  
ggactagtgt cgaccggta tggctgcgc

29

<210> 7  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 7

ggactagtgc catgggaccc gcagcggcag cgcctgg

38

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 8

gggcggccgc acccctgtga atcgtgcagg ctgagttatt

40

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 9

ggactagtac catgaagccc cgcgcgcgcg gatggcgggg c

41

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

ccctgtggtc aacctcgtag gcagagacca

30

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

ggcagttcgg agagaaaagcc aagctct

27

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

gggcggccgc caagttggac ttagagcaag tcttgagca

40

<210> 13

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 13

tggccttac cattgccccat cagtctggac acaactttgg c

41

<210> 14

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

gccaaagttg tgtccagact gatggcaat ggtgaaggcc a

41

<210> 15

<211> 31  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
caccttaagt agcttctgcc agtggcagtc t

31

<210> 16  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
acaaacatta cggctatcct ccgagcatgg ag

32

<210> 17  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 17  
ttcttaaggcac cgctcaagct atc

23

<210> 18  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 18  
gggccttcat caccatattt ca

22

<210> 19  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 19  
ccatgccatc ctgcgtctg

19

<210> 20  
<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

agggggccgga ctcgtcatac

20

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an amino acid sequence obtained by expression of a DNA containing a restriction enzyme NotI recognition nucleotide sequence and a nucleotide sequence encoding a FLAG tag amino acid sequence

<400> 21

Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

1

5

10

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

His Glu Ser Gly His

1

5

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 23

agcctagctc ccgatccaa

19

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 24

ccaccaccag agtctccaca t

21

<210> 25

<211> 15

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 25

aagcaggcgg ccgag

15

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 26

atcaaaggta gaagaatggg a

21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11251

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/40, C12N5/10, C12N9/50, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/573//C12P21/08, C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/40, C12N5/10, C12N9/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TORTORELLA M. et al., The thrombospondin Motif of Aggrecanase-1 (ADAMTS-4) Is Critical for Aggrecan Substrate Recognition and Cleavage. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Aug.2000, Vol.275, No.33, pages 25791 to 25797	1-15
A	COLIGE A. et al., Human Ehlers-Danlos Syndrome Type V11 and Bovine Dermatosparaxis Are Caused by Mutations in the Procollage I N-Proteinase Gene., Am.J.Hum.Genet., 1999, Vol.65, pages 308 to 317	1-15
A	ABBASZADE, I. et al., Cloning and Characterization of ADAMTS11, an Aggrecanase from the ADAMTS Family., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Aug.1999, Vol.274, No.33, pages 23443 to 23450	1-15
A	CARNINCI P. et al., Normalization and Subtraction of Cap-Trapper-Selected cDNAs to Prepare Full-Length cDNA Libraries for Rapid Discovery of New Genes., Genome Research, 2000, Vol.10, pages 1617 to 1630	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
12 March, 2002 (12.03.02)

Date of mailing of the international search report  
09 April, 2002 (09.04.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int. C17 C12N 15/09, C07K 16/40, C12N 5/10, C12N 9/50, G01N 33/15, G01N 33/50, G01N 33/573  
 // C12P 21/08, C12Q 1/37

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
 Int. C17 C12N 15/09, C07K 16/40, C12N 5/10, C12N 9/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 REGISTRY(STN), CA(STN), MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICSTファイル(JOIS),  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TORTORELLA M. et al., The Thrombospondin Motif of Aggrecanase-1 (ADAMTS-4) Is Critical for Aggrecan Substrate Recognition and Cleavage. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Aug. 2000, Vol. 275, No. 33, p. 25791-25797	1-15
A	COLIGE A. et al., Human Ehlers-Danlos Syndrome Type Vll Cand Bovine Dermatosparaxis Are Caused by Mutations in the Procollagen I N-Proteinase Gene., Am. J. Hum. Genet., 1999, Vol. 65, p. 308-317	1-15

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す  
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日  
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行  
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する  
文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって  
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論  
の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明  
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以  
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに  
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
12.03.02

国際調査報告の発送日

0904.02

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
鈴木 恵理子

4N 3038  
(印)

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C(続き) .	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ABBASZADE I. et al., Cloning and Characterization of ADAMTS11, an Aggrecanase from the ADAMTS Family., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Aug. 1999, Vol. 274, No. 33, p. 23443-23450	1-15
A	CARNINCI P. et al., Normalization and Subtraction of Cap-Trapper-Selected cDNAs to Prepare Full-Length cDNA Libraries for Rapid Discovery of New Genes., Genome Research, 2000, Vol. 10, p. 1617-1630	1-15